

施肥与季节更替对黑土微生物群落的影响

白震^{1,3}, 何红波¹, 解宏图^{1,2}, 张明⁴, 张旭东^{1,2*}

(1. 中国科学院沈阳应用生态研究所陆地生态过程重点实验室, 沈阳 110016; 2. 沈阳农田生态系统国家野外研究站, 沈阳 110016; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 4. 辽宁大学生命科学学院, 沈阳 110036)

摘要: 研究不同施肥处理与季节更替条件下黑土微生物群落结构与活力, 揭示影响黑土肥力质量的重要因素. 以未施肥耕作 (CK) 与休闲 (fallow) 处理为对照, 研究不同季节有机肥 (MCK) 处理与氮磷钾肥配施 (NPK) 处理对土壤微生物群落数量与结构影响, 测定微生物量碳 (氮) (C_{mic} 或 N_{mic}) 及不同菌群磷脂脂肪酸 (PLFA) 含量. 结果表明, 有机肥处理显著提高土壤养分、 C_{mic} 及各菌群 PLFA 含量; 休闲处理真菌 PLFA (均值 $8.40\text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$)、 C_{mic} (均值 $322.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和 N_{mic} (均值 $57.9\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 等含量显著高于 CK (分别为 $5.4\text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $152.6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $32.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 或 NPK (分别为 $3.5\text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $144.3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $30.7\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 处理; NPK 处理 C_{mic} 、 N_{mic} 及各菌群 PLFA 低于 CK 处理. 相关分析表明, 土壤各养分含量与 C_{mic} 、各菌群 PLFA 含量、 G^- /总细菌显著正相关, 与 G^+/G^- 显著负相关 ($p < 0.05$). PLFA 的主成分分析表明, 各季节不同施肥处理微生物群落结构显著不同. 土壤基本理化性质显著受季节更替影响, 耕作土壤与休闲处理微生物群落结构各自严格依取样时间而变化; C_{mic} 于仲春最高 ($295.6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 而 N_{mic} ($49.3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 与各菌群 PLFA 含量则在夏季最高, C_{mic} ($184.2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、 N_{mic} ($30.63\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 与各菌群 PLFA 含量在春季较低. 施肥与季节更替显著影响农田黑土肥力质量及微生物群落结构、活力.

关键词: 磷脂脂肪酸; 微生物量碳 (氮); 施肥; 季节更替

中图分类号: X171 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)11-3230-10

Influences of Fertilization and Seasonal Variation on Microbial Community in a Chinese Mollisol

BAI Zhen^{1,3}, HE Hong-bo¹, XIE Hong-tu^{1,2}, ZHANG Ming⁴, ZHANG Xu-dong^{1,2}

(1. Key Laboratory of Terrestrial Ecological Process, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; 2. National Research Station of Shenyang Agroecology, Shenyang 110016, China; 3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Biology College of Liaoning University, Shenyang 110036, China)

Abstract: Fertilization and seasonal variation play very important roles in affecting microbial structure and activity, as a result, leading to the significant evolution of soil fertility. The effect of manure (MCK) and combined application of chemical fertilizers (NPK) on soil microbial biomass and structure were studied by measuring soil microbial biomass carbon (nitrogen) and phospholipid fatty acid (PLFA) in different microbial communities, with the nil-fertilization (CK) and fallow as controls. Results show the manure application significantly improves the soil nutrient contents and the amounts of C_{mic} and PLFA of different microbial communities. The amounts of fungal PLFA ($8.40\text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$) and C_{mic} ($322.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and N_{mic} ($57.9\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) are significantly higher than those of CK ($5.4\text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$, $152.6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $32.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively) or NPK ($3.5\text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$, $144.3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $30.7\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively). And the contents of C_{mic} , N_{mic} and PLFA of different microbial groups in NPK are lower than those in CK. Correlation analyses show the soil nutrient contents are significantly positively correlated with C_{mic} , different microbial PLFA contents and G^- /total bacteria ratios, while negatively correlated with G^+/G^- bacteria ratio ($p < 0.05$). The principle component analysis of PLFA shows the microbial structures in different treatments and sampling dates are significantly different. Seasonal changes are also found to cause great fluctuations in soil basic properties, and microbial community structure in arable soils and fallow respectively cluster strictly together by sampling dates. The amount of C_{mic} is highest on April 11 ($295.6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), while N_{mic} ($49.3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and PLFA contents are highest in summer (July-August); the lowest amounts of C_{mic} ($184.2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), N_{mic} ($30.63\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and PLFA exist on May 31. Fertilization and seasonal variations significantly affect soil fertility, microbial structure and activity.

Key words: phospholipid fatty acid (PLFA); soil microbial biomass carbon (nitrogen); fertilization; seasonal changes

土壤微生物及其参与的过程, 是土壤肥力质量与养分循环的重要构件. 自然环境温度、湿度及作物生长等周而复始季节波动, 是微生物群落结构与底物利用能力的主要影响因素^[1,2]. 土壤微生物群落结构与活力因季节更替引起的变化, 要比因养分施用引起的变化大得多^[5,6]. 例如, 与夏季相比, 冬季菌群

有较高的真菌/细菌比值、嗜复杂底物 (如纤维素与

收稿日期: 2007-12-25; 修订日期: 2008-05-21
基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (40535028); 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KZCX3-SW-433)
作者简介: 白震 (1975~), 男, 博士研究生, 助理研究员, 主要研究方向为土壤微生物, E-mail: eshaizhen@163.com
* 通讯联系人, E-mail: xdzhang@iae.ac.cn

香草酸)而对简单氨基酸(如甘氨酸)利用率低^[7]. 磷脂脂肪酸(phospholipid fatty acid, PLFA),是活体微生物细胞膜恒定组分,种属差异明显,对环境因素敏感,可有效指示菌群结构、代谢活力等微生物群落特征^[3];氯仿熏蒸法测定的微生物量碳(氮)(C_{mic}或 N_{mic})则可反映土壤微生物量总体水平^[4].

东北黑土区是我国的“谷物粮仓”,而近几十年高强度耕作严重恶化了农田黑土物理、化学及生物学特性,最突出的表现是有机质(SOM)含量大幅下降,抗逆性和缓冲性减弱^[8]. 目前,我国对农田黑土的研究尚停留在土壤养分对作物有效性^[9]、耕作方式^[10]、微生物量及土壤酶活变化^[11-12]等方面,而对评价土壤肥力质量演变、保证黑土碳氮磷等养分可持续利用极为关键的土壤微生物群落却鲜见报道. 本研究拟通过测定不同季节、特定施肥处理农田黑土 PLFA 及土壤微生物量,揭示主导土壤肥力质量演变的黑土微生物群落季节变化特征,以期对东北黑土质量的改善提供参考.

1 材料与方法

1.1 试验地概况与样品采集

公主岭国家黑土长期肥料试验站(东经 124°48'33",北纬43°30'23"),始建于 1980 年,土壤原

始理化性质见表 1. 至今保持了相同处理和种植制度,作物为玉米. 化肥用量:氮,150 kg•(hm²•a)⁻¹,尿素;磷,32.73 kg•(hm²•a)⁻¹,重过磷酸钙;有机肥用量:有机质(OM),9 t•(hm²•a)⁻¹,猪粪. 4 月下旬施底肥,6 月下旬追肥:氮肥 1/3 为底肥,2/3 追施;磷肥全部做底肥;有机肥于上一年初秋收获后一次性施用. 本研究分别于 2005-09-29(上年季秋^[13],玉米收获后)、2006-04-11(仲春,玉米播种期,采样时温度为 6.5℃)、2006-05-31(季春,玉米苗期,23℃)、2006-07-01(初夏,玉米拔节期,24℃)、2006-08-08(季夏,玉米灌浆期,25℃)和 2006-09-24(仲秋,玉米收获后,18℃)分 6 次采集该试验站不同施肥处理 0~20 cm 耕层土壤,采样时各施肥处理均分 3 个小区作为重复,并于每个小区按蛇形方式取 5 点混匀后备用. 施肥处理为氮磷钾肥配施(NPK)、有机肥(MCK),以不施肥处理(CK)与休闲(fallow)处理为对照.

1.2 测定方法

鲜土于 24 h 内去除植物残体,过 2 mm 筛,立即测定 C_{mic}和 N_{mic};部分鲜土冻干保存,用于 PLFA 分析;其余土壤风干后测定基本理化性质. 磷脂分析试剂为色谱纯,其它试剂为分析纯. 水浸法测 pH, 105℃烘 6~8 h 恒重后测土壤含水量,有机碳(C_{org})采用有机碳分析仪高温燃烧测定;凯氏消煮法测总

表 1 土壤原始理化性质^[14]

Table 1 Basic properties of original bulk soil							
pH	有机碳/g•kg ⁻¹	有机氮/g•kg ⁻¹	全磷/g•kg ⁻¹	全钾/g•kg ⁻¹	碱解氮/mg•kg ⁻¹	速效磷/mg•kg ⁻¹	速效钾/mg•kg ⁻¹
7.6	20.19	1.65	1.25	20.62	111.29	5.04	127.06

氮(TN);速效钾(RAK)采用乙酸铵浸提火焰光度计法测定;有效磷(AP)采用碳酸氢钠提取钼锑抗比色紫外吸收测定;碱解扩散法测定碱解氮(AN);氯仿熏蒸法测定 C_{mic}或 N_{mic}^[4]. PLFA 提取参照 Bligh-Dyer 等^[15]修正方法,酯化 C19:0 为内标,用 Agilent 6890 气相色谱仪(GC)测定. 色谱条件:HP-5 柱(30.0 m×320 μm×0.25 μm),进样量 1 μL,分流比 10:1,载气(N₂)流速 0.8 mL/min. 初始温度 140℃维持 3 min,分 3 个阶段程序性升温:140~190℃,4℃/min,保持 1 min;190~230℃,3℃/min,保持 1 min;230~300℃,10℃/min,保持 2 min. 火焰离子检测器(FID)检测. 峰面积通过计算机自动积分,各脂肪酸的定性定量分别参照 BAME(bacterial acid methyl esters) Mix 和 Supelcoe 37 Component FAME Mix. 真菌以多不饱和脂肪酸(POLY)18L:2ω6, 9c 指示;以 i15:0、a15:0、15:0、i16:0、16:1ω9、i17:0、cy17:0 等作为总细菌源脂肪酸

(total Bacterial PLFA),这里亦用饱和脂肪酸(normal saturated fatty acids, NSAT)14:0、15:0、16:0、17:0、18:0之和辅助指示细菌生物量;G⁺菌以 i15:0、a15:0、i16:0、i17:0 等支链脂肪酸(terminally branched saturated fatty acids, TBSAT)表示;G⁻菌以 16:1ω9 单烯不饱和脂肪酸或环化脂肪酸(cyclopropyl fatty acids, CYCLO)cy17:0 表示;微生物总量以各脂肪酸加和表示(total PLFA, totPLFAs)^[16-23].

1.3 数据分析

利用 SPSS 13.0 处理数据,方差分析采用 LSD 法检验施肥与取样日期对主要土壤理化性质影响显著性(3 次重复). 主成分分析具体指标为:最大迭代步数为 25;公因子提取采用主成分分析法;KMO 与球形假设检验均表明各变量适合因子分析. 相关分析采用二元变量相关分析过程(即 Analyze-Correlate-Bivariate),相关系数为 Person, 双尾假设检验, p <

0.05 为显著相关, $p < 0.01$ 为极显著相关.

2 结果与讨论

2.1 土壤基本理化性质的变化

土壤 pH、 C_{org} 、TN、AN、AP、RAK 等受施肥、季节更替以及施肥-季节更替交互作用影响显著 ($p < 0.05$) (表 2、3). 施用有机肥明显降低了土壤的 pH 值, 提高了土壤 C_{org} 、TN、AN、AP、RAK 含量; 其中, 以 AP 含量增加最为显著, 比 CK 高 31.0 倍 (表 2). 显然, 有机肥中大量有机酸等易降解底物, 是土壤 pH 降低、养分含量增加的主要原因^[23]. 在未施有机肥的 3 个处理中, NPK 处理 TN 含量略高于休闲和 CK

处理; NPK 和休闲处理 AP、RAK 含量明显高于 CK (表 2). 长期氮磷钾肥施用可提高土壤个别养分含量; 而休闲处理较少机械翻耕等人为措施, 保证了土壤 AP、RAK 等养分不过分暴露而保蓄在土壤团聚体等结构中. 仲春土壤含水量高于季春, 可能是由于前者温度较低 (6.5°C) (见 1.1) 而使得冬季残留水分散失较少; 季春 RAK 含量少于仲春, 可能是由于季春期作物生长对 RAK 有一定的消耗. TN 含量呈现明显季节变化特征并导致 C_{org} /TN 发生相应改变: TN 在上年季秋最高, 翌年春季 (4~5 月) 较低, 仲秋最低; C_{org} /TN 比值则在上年季秋最低, 而在翌年仲秋最高 (表 2).

表 2 施肥处理或取样日期对土壤主要理化特性影响¹⁾

变量	施肥 ²⁾						日期 ³⁾							
	A	B	C	D	F	p	1	2	3	4	5	6	F	p
pH	8.06	8.04	7.68	8.01	75.8	* *	7.87	7.93	7.93	8.00	7.95	8.01	1.05	0.396
H ₂ O/%	17.1	17.2	16.3	16.2	1.49	0.226	16.5	18.7	15.5	17.2	16.7	15.7	7.00	* *
$C_{org}/\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	19.0	19.0	27.8	18.3	148	* *	22.1	19.9	21.1	21.9	21.4	19.6	0.699	0.626
$\text{TN}/\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	1.34	1.46	2.02	1.39	26.3	* *	1.90	1.45	1.41	1.78	1.57	1.21	8.24	* *
C_{org}/TN	14.6	13.5	13.9	13.4	1.18	0.323	11.7	13.9	14.9	12.2	13.6	16.7	23.3	* *
$\text{AN}/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	92.7	98.0	143	96.4	163	* *	106	110	101	113	111	102	0.588	0.709
$\text{AP}/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	6.34	12.4	197	13.8	543	* *	52.0	63.3	58.3	64.6	53.4	52.8	0.05	0.998
$\text{RAK}/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	139	152	233	172	40.4	* *	220	177	154	165	168	161	4.10	*

1) * 表示 $p < 0.05$, * * 表示 $p < 0.01$, 下同; 2) 各施肥处理中, A 为 CK、B 为 NPK、C 为 MCK、D 为休闲; 3) 在取样日期中, 1 为 2005-09-29、2 为 2006-04-11、3 为 2006-05-31、4 为 2006-07-01、5 为 2006-08-08、6 为 2006-09-24

表 3 不同处理与取样时间对土壤基本特性影响的方差分析¹⁾

Table 3 Overall effects of management and sampling date on soil characteristics using ANOVA						
变量	施肥处理 (df = 3)		取样日期 (df = 5)		施肥 × 日期 (df = 15)	
	F	p	F	p	F	p
pH	31 756.7	* *	1 823.1	* *	1 287.9	* *
H ₂ O/%	74.9	* *	252.4	* *	141.4	* *
$C_{org}/\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	4 000.6	* *	139.2	* *	73.0	* *
$\text{TN}/\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	1 688.5	* *	724.6	* *	46.0	* *
C_{org}/TN	23.9	* *	184.7	* *	26.9	* *
$\text{AN}/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	1971.0	* *	57.4	* *	32.4	* *
$\text{AP}/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	1 428.4	* *	3.4	*	7.6	* *
$\text{RAK}/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	51 994.1	* *	11 533.6	* *	1 981.2	* *

1) df 表示自由度

2.2 土壤微生物量的变化

2.2.1 氯仿熏蒸法测定土壤微生物量的变化

土壤微生物量及其相关指标受季节更替和施肥处理显著影响 ($p < 0.001$) (图 1). C_{mic} 、 N_{mic} 、 C_{mic}/C_{org} 、 N_{mic}/TN 、 C_{org}/TN 、 C_{mic}/N_{mic} 等季节性差异显著 ($p < 0.05$), 其中以 C_{mic} 含量变幅最小 ($F = 2.57$, $p < 0.05$), C_{org}/TN 与 C_{mic}/N_{mic} 比值变幅较大 ($F = 23.27$,

$p < 0.001$; $F = 18.70$, $p < 0.001$) (图 1). Lipson 等^[7]认为, 早春雪融至初夏约 30 d 内, 微生物量会随土壤养分含量与温度聚变而迅速下降, 之后, 随植物生长而再次活跃. 本研究 C_{mic} 季节变化规律与上述报道相同, 最高值在仲春 ($295.6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 而最低值在季春 ($184.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 自初夏开始回升 (以 CK 及 NPK 处理变化尤为明显, 图 1A). 微生物量季节变化利于养分循环与 SOM 积累: 由夏至冬, 大量死亡微生物释放质膜等结构物质会转化为腐殖酸等 SOM; 翌年春季, SOM 含量的增加又促进微生物对土壤养分矿化固持^[7]. 仲春 C_{mic} 较高, 可能与下列因素有关: ①土壤温度回升至零度以上 (6.5°C , 见 1.1 节), 冬季残留冰雪逐渐融化 (表 2); ②土壤微生物开始恢复其代谢活力, 而上年冬季积累的 SOM 又提供丰富的速效氮、磷等易降解底物 (AN、AP 含量较高, 见表 2)^[1,6,19]. 由仲春至季春, C_{mic} 有明显下降趋势, 其原因可能是: ①土壤速效养分含量明显降低, 如 RAK 含量由仲春 $177(\text{mg}/\text{kg})$ 降至 $154(\text{mg}/\text{kg})$, 降幅约 13%; AP 由仲春 $63.3(\text{mg}/\text{kg})$ 降至 $58.3(\text{mg}/\text{kg})$, 降幅约 8%; AN 含量由仲春 $110(\text{mg}/\text{kg})$ 降至 101

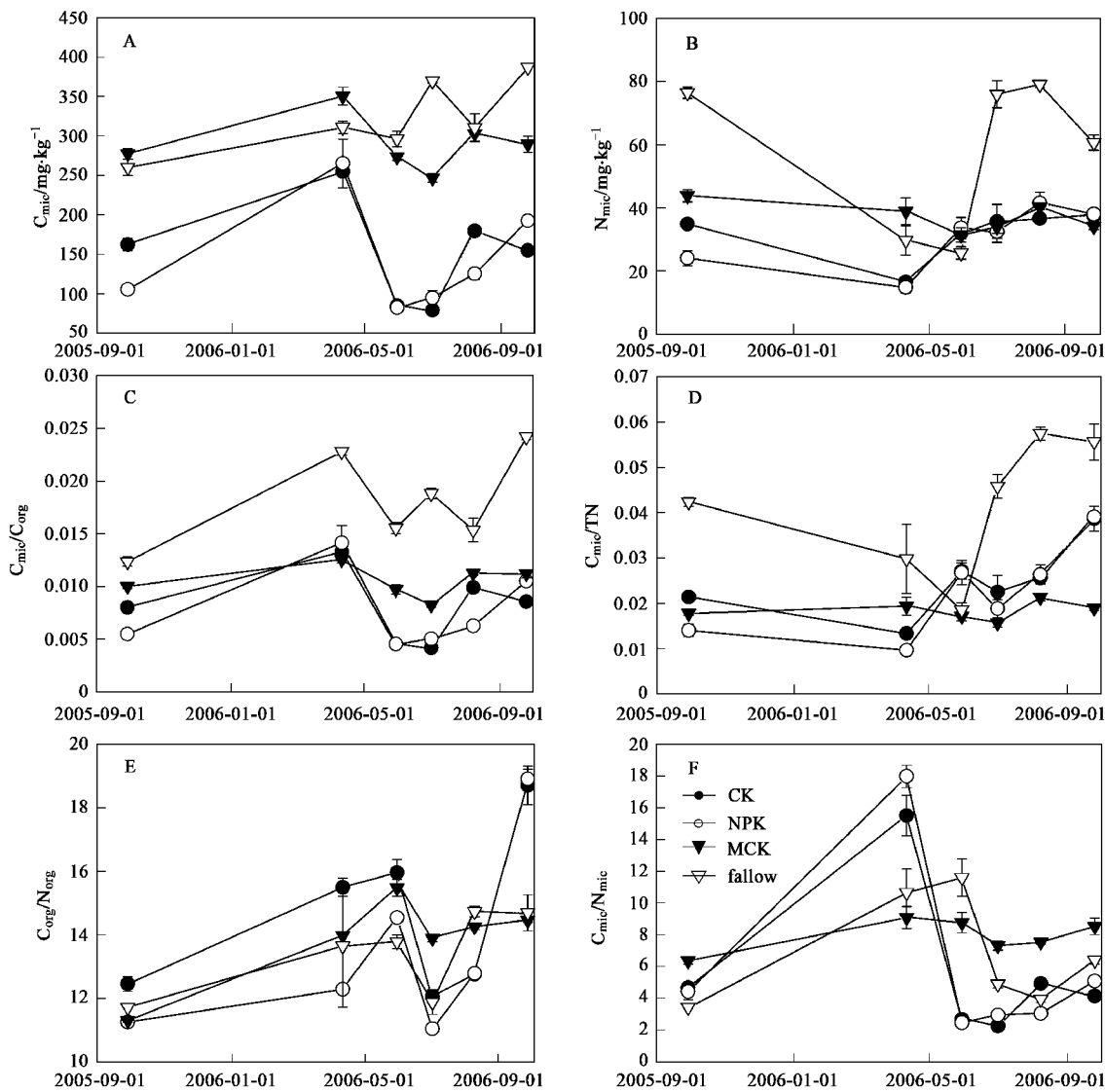


图 1 不同处理微生物量碳氮及相关指标季节变化

Fig.1 Seasonal changes of C_{mic} (N_{mic}) amounts and the correlated ratios in different treatments

(mg/kg),降幅约 8%. ②土壤含水量下降明显,由仲春 18.7%降至季春的 15.5%,降幅约 17%(表 2).播种期机械翻耕等人为因素,也可能会损伤、破坏真菌菌丝体并减少土壤 C_{mic} ^[2].而初夏玉米进入拔节等旺盛生长期,其根际分泌的大量有机物则成为土壤微生物极好碳源底物;再加上早期残体输入、作物生长期根系分泌物大量累积等效应,最终促进微生物量不断升高^[2]. C_{mic}/C_{org} 是微生物量对 C_{org} 贡献或底物碳可用性的重要指标,可反映满足微生物生长的土壤碳底物质量^[22];仲春最高 $C_{mic}/C_{org} = 13.31$ ($p < 0.001$,图 1F),暗示该季节土壤碳源较易被微生物所利用. N_{mic} 与 N_{mic}/TN 由春至秋逐渐升高,最低值出现在仲春,最高值分别在季夏、仲秋两季(图 1B、1D).不同季节 C_{mic} 、 N_{mic} 变化规律存在差异是较为普

遍现象,Spedding 等^[2]研究发现,耕层土壤 C_{mic} 受时间影响较小,仅 10~20 cm 耕层土壤 C_{mic} 在 5 月显著高于其它季节;而 N_{mic} 受季节影响显著,表现为 7、8 月显著高于 5、6 月. C_{mic} 与 N_{mic} 季节变化规律不同可能与土壤碳氮底物可用性差异有关. Spedding 等^[2]认为初夏 N_{mic} 较高的原因,是取样前施用了含 N 量为 $140\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 的硝酸铵促进了土壤 DON 浓度增加,导致土壤微生物群落结构向有利于 N 含量提高的种群转变;因此, N_{mic} 升高可能是由于土壤微生物对 N 素的奢侈消耗(luxury consumption). C_{mic}/N_{mic} 季节变化说明,微生物群落结构在不同季节间可能存在差异.

不同处理的 C_{mic} 、 N_{mic} 、 C_{mic}/C_{org} 、 N_{mic}/N_{org} 等显著不

同,其中以休闲处理为最高 ($F > 16, p < 0.001$, 图 1). C_{mic} 与 C_{mic}/C_{org} 变化最为显著(前者 $F = 53.1, p < 0.001$; 后者 $F = 38.2, p < 0.001$), 前者休闲 ($322.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 与 MCK 处理 ($290.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 分别是 NPK 处理 ($144.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的 2.23 与 2.01 倍, 后者休闲 (0.018 2) 与 MCK (0.010 5) 处理分别是 NPK 处理 (0.007 64) 的 2.38 与 1.37 倍. Bossio 等^[5] 研究表明, 不同取样日期有机肥处理 C_{mic} 均显著高于化肥处理 ($p < 0.01$). Spedding 等^[2] 认为, C_{mic} 通常与有机质输入密切相关, 有机肥处理中高量有机质输入, 可促进土壤微生物量持续增加且显著高于常规施肥处理^[5,23]. NPK 处理微生物量始终处于较低水平甚至低于 CK 处理(图 1、2), 其原因可能在于: ①长期施用 N、P、K 肥使作物对土壤有机碳氮等底物需求更

为迫切, 导致作物与微生物群落竞争土壤有效养分并抑制后者生长; ②化肥中有毒金属污染物积累也会在一定程度上损伤敏感微生物群落^[24]. 休闲处理微生物量较高的原因可能在于: ①较少机械翻耕破碎等人为因素干扰, 可保护土壤团聚体等结构不被破坏, 避免有机和无机底物过分暴露于空气而被迅速耗竭, 再加上不会因植被砍伐移出而损失大量养分, 因而, 休闲处理保蓄了大量 AP、AN、RAK 等速效养分(表 2); ②较少机械翻耕可保护以菌丝体结构为主的真菌组织不被破坏而长期稳定积累, 使土壤微生物量维持在较高水平^[6,19]. MCK 与 NPK 或 CK 处理之间 N_{mic} 、 N_{mic}/TN 无显著差异, 暗示有机肥施用并未影响 N_{mic} 或提高微生物对氮底物利用效率. C_{org}/TN , 尤其 C_{mic}/N_{mic} 无显著变化 ($F < 1.2, p > 0.05$).

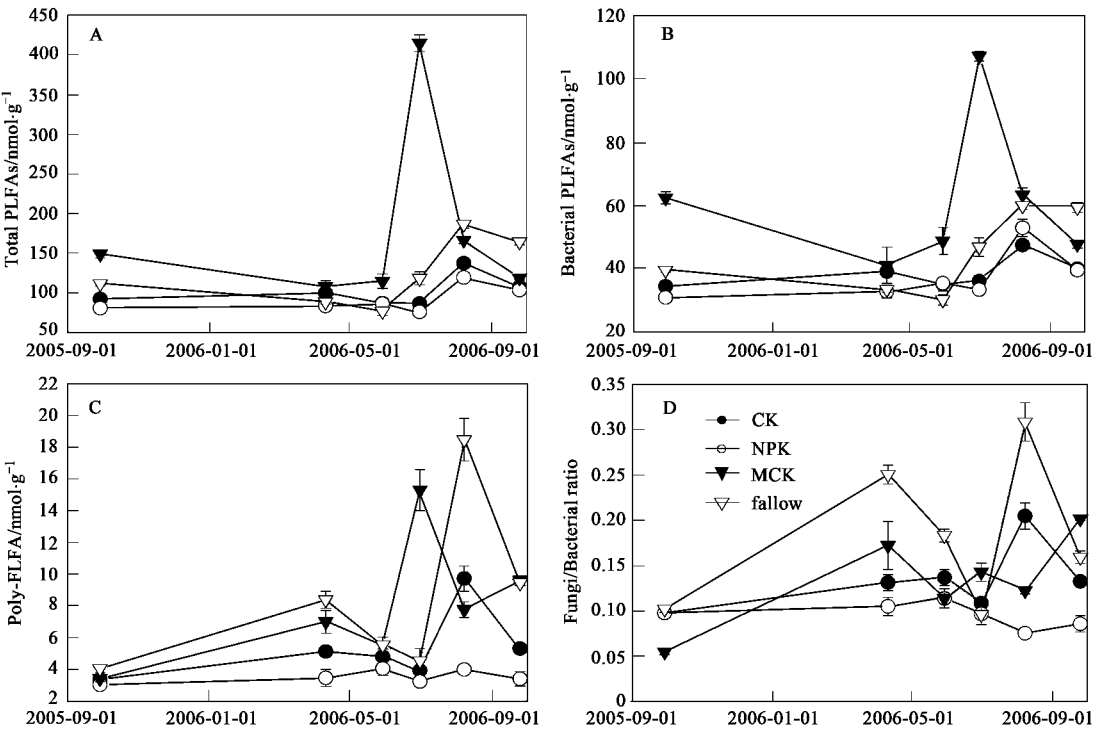


图 2 不同处理土壤真菌、细菌组成与比例季节变化

Fig. 2 Seasonal changes of PLFA contents and their ratios in different treatments

2.2.2.2 PLFA 法测定土壤各菌群生物量的变化

土壤微生物各菌群 PLFA 含量亦呈现显著季节变化特征 ($p < 0.05$) (图 2). 总微生物、细菌以及真菌 PLFA 均以夏季为最高, 春秋两季较低 ($p < 0.05$). 就总 PLFA 而言, 初夏 ($173.6 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$) 与季夏 ($152.1 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$) 比季春 ($90.9 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$) 和仲春 ($94.7 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$) 高 1.6~1.9 倍; 细菌 PLFA 亦同, 初夏 ($55.83 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$) 与季夏 ($55.87 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$) 比季春

($37.34 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$) 和仲春 ($36.59 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$) 高 1.5 倍左右; 真菌亦在季夏 ($9.98 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$) 最高, 最低值则出现在上年季秋 ($3.46 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$). 真菌/细菌 PLFA 在季夏最高 (0.178), 最低值在上年季秋 (0.088) ($p < 0.01$). Buyer 等^[25] 利用菌群平板计数研究发现, 细菌数量在 7 月份最高; 真菌则在 6~7 月数量显著升高, 在 8 月并没有下降. Spedding 等^[2] 研究发现, 真菌 PLFA、总 PLFA 在整个玉米生长季呈上升趋势,

真菌/细菌PLFA 及真菌生物量在夏季最高,其原因可能与真菌菌丝体季节性生长有关;另外,夏季作物生长旺盛,根系分泌物增加并在土壤中不断积累,也会逐渐提高活体微生物数量与活力.比较 C_{mic} (N_{mic}) 与 PLFA 结果发现, N_{mic} 与 PLFA 均在夏季(7~8月)最高,而 C_{mic} 则在仲春较高.氯仿熏蒸法与 PLFA 法测定的微生物量结果不完全一致,其原因在于:①二者所测定的微生物结构组分不同,PLFA 法所测定的是活体细胞膜磷脂含量,而氯仿熏蒸法测定的是死亡细胞质体溶出的有机态碳氮;②黑土区仲春季节里强烈的冻融作用,也可能导致以氯仿熏蒸法测定的有机碳氮与 PLFA 法测定的活体膜质体的代谢速率存在极大的差异.

不同处理显著改变黑土活体微生物数量,以 MCK 处理最高、NPK 与 CK 处理较低($p < 0.001$),休闲处理居中(图 2);各菌群 PLFA 含量均与土壤养分

含量显著正相关(表 4).以总 PLFA 含量变化为例, MCK 处理 ($178.4 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$) 最高,休闲处理次之 ($124.1 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$),NPK 与 CK 处理最低(分别为 91.3 和 $101.4 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$);细菌 PLFA 与总 PLFA 变化规律较为相似. Schutter 等^[1]认为,在夏季林荫密蔽期,休闲处理总细菌生物量高于化肥处理.真菌 PLFA 最低值亦在 NPK 处理 ($3.52 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$),CK ($5.36 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$)比 NPK 处理高 1.52 倍;而休闲与 MCK 处理极为接近(分别为 8.40 和 $8.10 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$).真菌生物量变化一方面说明,休闲处理极有利于土壤菌丝体为主的真菌生物量的积累^[1];另一方面也说明,休闲处理氯仿熏蒸法测定的 C_{mic} 、 N_{mic} 之所以较高,极有可能与休闲处理真菌生物量较高有关^[19](图 1A、1B).显然,有机肥施用更易促进细菌生长,化肥对细菌影响不明显;真菌生长虽然对有机肥施用并不敏感,但显著受化肥抑制($p < 0.001$)(图 2).

表 4 土壤基本理化性质与微生物量碳(氮)、各菌群 PLFA 含量相关分析¹⁾

Table 4 Correlations between soil basic properties and amounts of soil microbial biomass C(N), PLFA of different microbial communities								
指标	H ₂ O/%	pH	AN/mg·kg ⁻¹	RAK/mg·kg ⁻¹	AP/mg·kg ⁻¹	C _{org} /g·kg ⁻¹	TN/g·kg ⁻¹	C _{org} /TN
$C_{mic}/\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	-0.135	-0.395**	0.427**	0.469**	0.410**	0.267*	0.170	0.028
$N_{mic}/\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	-0.337**	0.008	-0.024	0.210	-0.041	0.005	0.074	-0.095
C_{mic}/N_{mic}	0.251*	-0.220	0.227	0.107	0.185	0.091	0.001	0.059
N_{mic}/TN	-0.352**	0.365**	-0.360**	-0.163	-0.347**	-0.381**	-0.445**	0.290*
C_{mic}/C_{org}	-0.063	0.046	-0.028	0.086	-0.040	-0.240*	-0.249*	0.055
totPLFAs/nmol·g ⁻¹	-0.048	-0.320**	0.609**	0.471**	0.438**	0.525**	0.381**	0.049
totBac/nmol·g ⁻¹	-0.126	-0.395**	0.681**	0.533**	0.536**	0.602**	0.458**	0.034
POLY/nmol·g ⁻¹	-0.059	-0.137	0.316**	0.204	0.239*	0.226	0.029	0.171
POLY/totBac	0.077	0.092	-0.069	-0.100	-0.037	-0.157	-0.306**	0.197
TBSAT/nmol·g ⁻¹	-0.227	-0.362**	0.623**	0.463**	0.524**	0.556**	0.384**	0.103
CYCLO/nmol·g ⁻¹	-0.177	-0.428**	0.675**	0.572**	0.574**	0.600**	0.432**	0.085
MONO/nmol·g ⁻¹	0.013	-0.313**	0.585**	0.463**	0.395**	0.514**	0.378**	0.042
NSAT/nmol·g ⁻¹	-0.072	-0.271*	0.582**	0.439**	0.429**	0.478**	0.379**	-0.006
TBS/CYCLO	-0.037	0.474**	-0.488**	-0.656**	-0.450**	-0.405**	-0.297*	-0.052
TBS/MONO	0.147	0.292*	-0.305**	-0.296*	-0.182	-0.421**	-0.317**	-0.067
TBSAT/NSAT	-0.411**	-0.169	0.013	-0.054	0.168	0.133	-0.080	0.334**
MONO/NSAT	0.010	-0.384**	0.549**	0.518**	0.356**	0.515**	0.353**	0.095
CYCLO/NSAT	-0.311**	-0.461**	0.331**	0.386**	0.447**	0.388**	0.151	0.291*

1) totBac 表示总细菌脂肪酸; MONO 表示单烯不饱和脂肪酸

不同土壤处理显著影响总细菌脂肪酸(NSAT)、G⁺ 菌脂肪酸(TBSAT)和 G⁻ 菌脂肪酸(CYCLO 或 MONO)含量($p < 0.01$),以 MCK 处理最高, NPK 与 CK 处理最低,休闲处理居中(图 3);并且,各细菌菌群脂肪酸与土壤养分含量显著正相关($p < 0.05$)(表 4).以 TBSAT/MONO 计算的 G⁺/G⁻ 菌受土壤处理影响未达显著水平($F = 2.391, p = 0.076$);但以 TBSAT/CYCLO 计算的 G⁺/G⁻ 菌比值却显著受施肥处理影响($F = 14.748, p < 0.001$),CK(5.84)与 NPK (5.66)处理最高,休闲(5.25)与 MCK(5.08)较低. G⁺/G⁻ 菌与土壤各养分含量显著负相关(除 AP 外)

(表 4). Kieft 等^[26]认为,节杆菌等 G⁺ 菌对饥饿条件适应能力极强,而假单胞菌等 G⁻ 菌适应力较差,受底物供应水平影响显著; Marschner 等^[27]也认为,有机质组成及其可用性差异,是 G⁺/G⁻ 菌变化的主要原因.正是由于 G⁺ 菌对底物利用等竞争力显著强于 G⁻ 菌,使得 G⁺ 菌在适当水热、养分条件下能比 G⁻ 菌更为迅速地攫取有限养分并快速繁殖:总细菌脂肪酸(NSAT)、G⁺ 菌脂肪酸(TBSAT)呈现显著季节动态特征($p < 0.01$)(图 3),以夏季(7~8月)较高,春季(4~5月)较低;G⁻ 菌脂肪酸(MONO 或 CYCLO)各季节间差异未达显著水平(p 值分别为 0.053 与

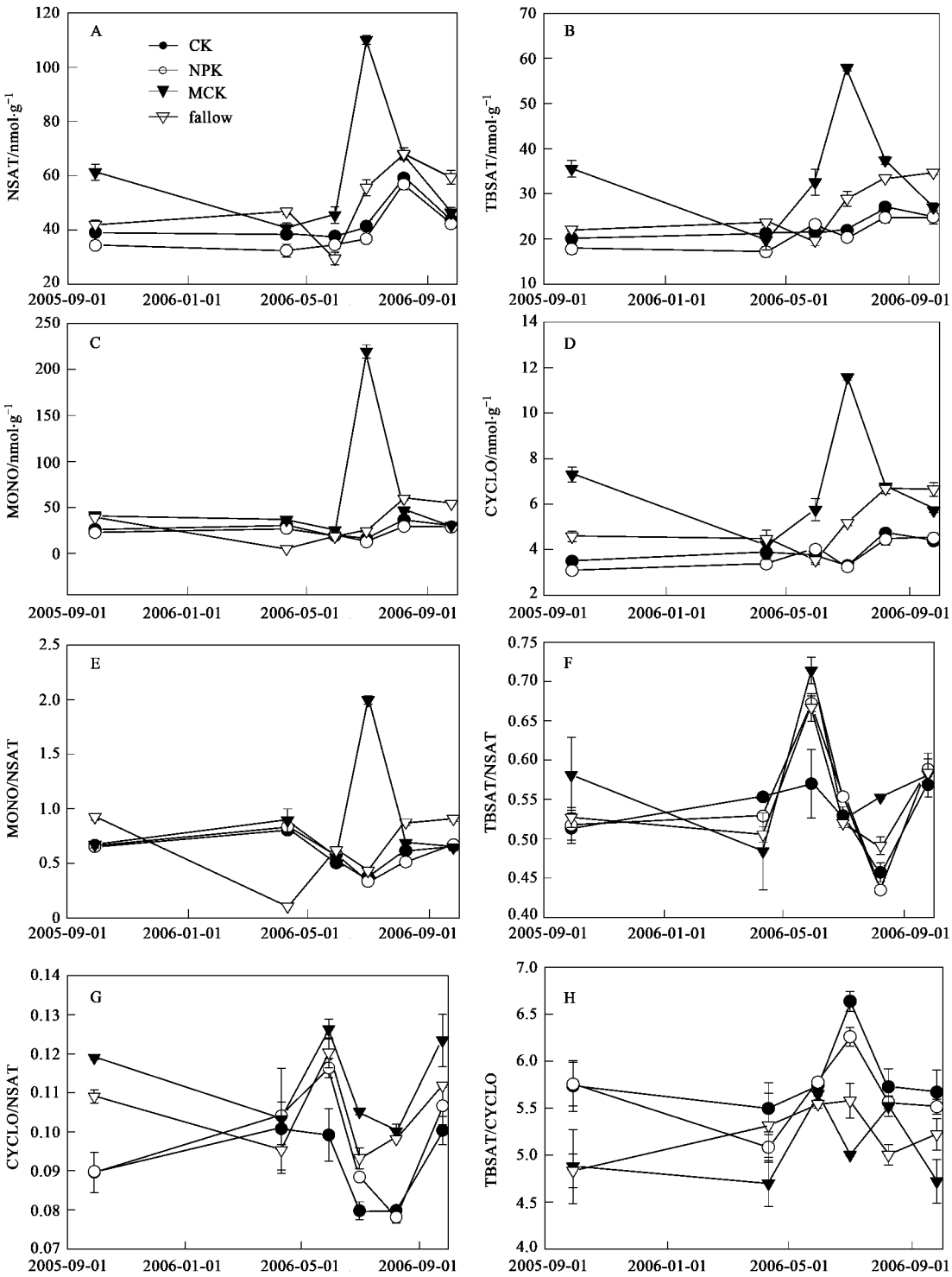


图 3 各处理细菌 PLFAs 数量季节变化

Fig.3 Seasonal changes of bacterial PLFAs contents in different treatments

0.065); G^- 菌/总细菌(CYCLO/NSAT)在夏季显著低于季春或秋季, 而 G^+ 菌/ G^- 菌(TBSAT/CYCLO)则在季春与初夏较高, 仲春与秋季较低(图 3)。

各细菌脂肪酸相关分析表明(图 4): 各细菌脂肪酸加和与 NSAT($r = 0.967$)、NSAT 与 TBSAT($r =$

0.943)之间均极显著相关($p < 0.001$). 可见, 在农田黑土特定季节、土地利用条件下, NSAT 含量可指示细菌群落总体水平; 并且, G^+ 菌与细菌总量变化趋于一致。

2.3 土壤微生物群落结构的变化

PLFA 主成分分析(PCA)表明,土壤处理方式与季节更替显著影响黑土菌群结构(图 5).上年季秋与翌年仲秋各处理菌群结构极为相似,MCK 处理对主成分 1(PC1)贡献较大,休闲处理对主成分 2(PC2)贡献较大,CK 与 NPK 处理均介于休闲、MCK 之间.仲春与初夏菌群结构差异显著:前者休闲与其它处理明显不同,CK、NPK、MCK 极为接近且对 PC2 贡献较大,而休闲处理对 PC1 贡献较大;后者的 MCK 处理群落组成则更为特殊并对 PC2 贡献较大,休闲、CK、NPK 几乎重叠且对 PC1 贡献较大.季春与季夏的 NPK 与休闲处理对 PC 贡献截然相反:前者,NPK 处理对 PC2 贡献较大,休闲处理对 PC1 贡献较大;后者,休闲处理对 PC2 贡献较大,NPK 处理对 PC1 贡献较大.Bossio 等^[5]就 PLFA 组成分析表明,不同季节有机肥与无机肥处理之间菌群结构存在明显差异.作物旺盛生长期(如初夏玉米拔节期和季夏玉米灌浆期),CK 与 NPK

处理较为接近,其原因可能在于,作物因旺盛生长而向土壤中分泌了大量有机碳等易降解底物,促进了土壤相似的优势菌群生长,从而抵消了因化肥施用所导致的 NPK 与 CK 处理之间菌群原有差异^[5].

Schutter 等^[1]PLFA 分析表明,春季菌群结构与夏季林荫密闭或收获期之间差异显著.Spedding 等^[2]对各季节样品进行判别分析时发现,取样日期的影响超过残体施用或耕作方式而占据明显的主导地位:播种期前(5 月 7 日)与播种期后 6 周(6 月 25 日)各处理聚为一类,在 PLFA 组成上几乎没有区别;作物生长旺盛期(7 月 16 日)与收获前(9 月 29 日)残体施用或耕作方式分异明显.本研究结果亦表明,各季节不同处理菌群结构显著受取样时间影响,耕作土壤与休闲处理分别严格按取样时间聚类(图 5A):就耕作土壤 CK、NPK 及 MCK 处理而言,仲春居于原点右上方,秋季及季夏居中,季春与初夏在原点右侧;休闲处理

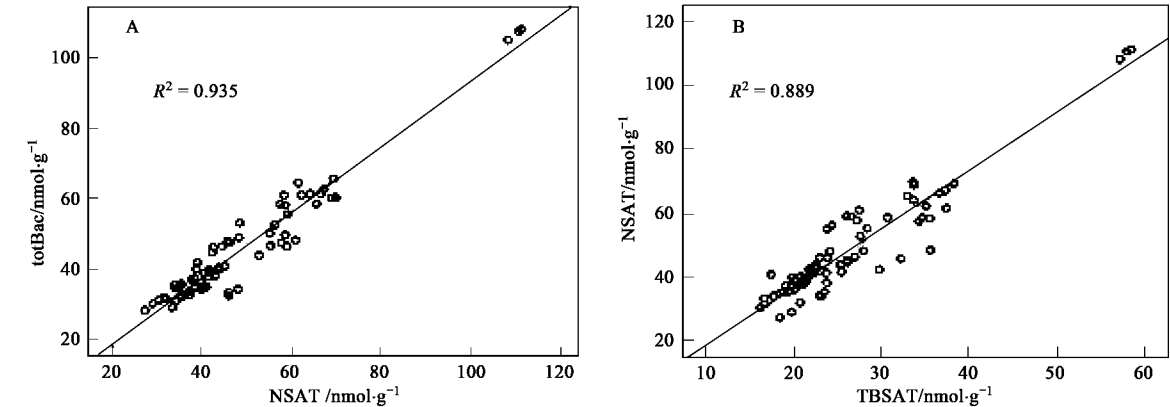
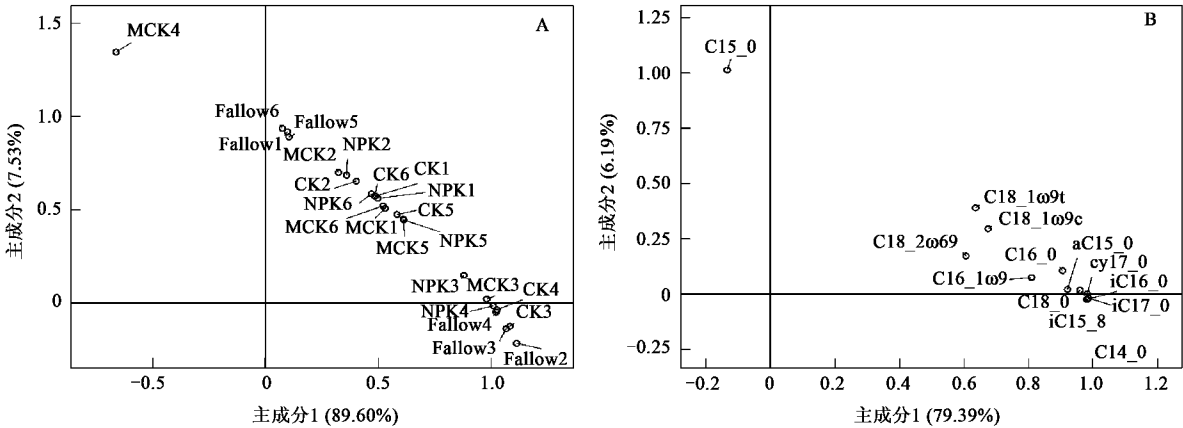


图 4 各细菌 PLFAs 相关性分析
Fig.4 Correlation between different bacterial PLFAs



1. 2005-09-29; 2. 2006-04-11; 3. 2006-05-31; 4. 2006-07-01; 5. 2006-08-08; 6. 2006-09-24

图 5 不同季节各处理及个别脂肪酸载荷值主成分分析

Fig.5 Principal component analysis of PLFAs showing score plots for the different treatments and loading values for the individual PLFAs

主要聚成两类,秋季及季夏居于原点上方,而春季与初夏聚于原点右下方.季春与初夏(除 MCK)各处理对 PC1 贡献最大(载荷值 > 0.88)(图 5A). Hamel 等^[28]应用 PLFA 判别分析亦表明,在作物不同生长期,休闲与小麦-休闲轮作处理土壤微生物群落结构明显不同.休闲与耕作处理土壤微生物群落结构差异可能在于,频繁耕作会引起有机质快速分解^[5];另外,植物根系生长导致土壤底物可用性变化,并因此改变土壤菌群结构^[29].个别 PLFA 载荷值结果表明,细菌 PLFA(14:0、16:0、18:0)、G⁺ 菌 PLFA(i15:0、a15:0、i16:0、i17:0)及 G⁻ 菌 PLFA(cy17:0)对 PC1 贡献最大(载荷值 > 0.91,图 5B).比较图 5A 与 5B 可见,细菌脂肪酸较易在季春与初夏富集.

3 结论

(1)有机肥处理显著提高土壤各养分含量,对提升黑土肥力质量至关重要;而仅氮磷钾等化肥配施未显著提高土壤有机碳或全氮养分含量;休闲处理在一定程度上避免了土壤速效氮、磷、钾等养分过度消耗.部分土壤基本理化性质随季节更替而显著不同,如季春土壤水分与速效钾含量最低,仲春较高.

(2)有机肥中大量有效养分有利于 C_{mic}、N_{mic} 及各菌群 PLFA 含量增加;休闲处理较少机械翻耕等人为措施保证真菌菌丝体持续生长,因此,能有效提高土壤 C_{mic}、N_{mic} 水平;仅氮磷钾等化肥配施显著抑制土壤真菌生长,不利于微生物量积累;土壤各养分含量与 C_{mic}、各菌群 PLFA 含量、G⁻/总细菌显著正相关,而与 G⁺/G⁻ 显著负相关.季节性温、湿度差异以及植物生长,显著影响土壤微生物量水平;夏季土壤 N_{mic} 与各菌群 PLFA 数量较高,C_{mic} 则在仲春最高.

(3)微生物群落结构受土壤利用方式显著影响,休闲与耕作土壤差异明显,氮磷钾配施与对照处理最为接近;季节更替对微生物群落结构影响甚至超过土壤利用方式,主要表现是耕作土壤与休闲处理微生物群落结构分别严格按取样时间聚类.

参考文献:

- [1] Schutter M E, Sandeno J M, Dick R P. Seasonal, soil type, and alternative management influences on microbial communities of vegetable cropping systems [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2001, **34**: 397-410.
- [2] Spedding T A, Hamel C, Mehuys G R, *et al.* Soil microbial dynamics in maize-growing soil under different tillage and residue management systems [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, **36**: 499-512.
- [3] 白震,何红波,张威,等.磷脂脂肪酸技术及其在土壤微生物研究中的应用[J].*生态学报*, 2006, **2**(7): 2387-2395.
- [4] 鲁如坤.土壤农业化学分析方法[M].北京:中国农业科技出版社,1999.
- [5] Bossio D A, Scow K M, Gunapala N, *et al.* Determinants of Soil Microbial Communities: Effects of Agricultural Management, Season, and Soil Type on Phospholipid Fatty Acid Profiles [J]. *Microbial Ecology*, 1998, **36**: 1-12.
- [6] Bardgett R D, Lovell R D, Hobbs P J, *et al.* Seasonal changes in soil microbial communities along a fertility gradient of temperate grasslands [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1999, **31**: 1021-1030.
- [7] Lipson D A, Schadt C W, Schmidt S K. Changes in soil microbial community structure and function in an Alpine dry meadow following spring snow melt [J]. *Microbial Ecology*, 2002, **43**: 307-314.
- [8] 赵兰坡,王鸿斌,刘会青,等.松辽平原玉米带黑土肥力奴化机理研究[J].*土壤学报*, 2006, **43**(1): 79-84.
- [9] 王建国,刘鸿翔.黑土农田养分供应能力和变化[J].*土壤学报*, 1997, **34**(3): 295-301.
- [10] 刘鸿翔,王德禄,张素君,等.松嫩平原黑土区不同养分循环结构农业经营制度比较研究[J].*应用生态学报*, 1994, **5**(2): 148-151.
- [11] 李东坡,陈利军,武志杰,等.不同施肥黑土微生物量氮变化特征及相关因素[J].*应用生态学报*, 2004, **15**(10): 1891-1896.
- [12] 诸葛玉平,张旭东,刘启.长期施肥对黑土呼吸过程的影响[J].*土壤通报*, 2005, **36**: 391-394.
- [13] 高仲元.长春的物候季节与自然历(1984-1988)[J].*东北师大学报自然科学版*, 1991, **3**: 91-97.
- [14] 彭畅,朱平,高洪军,等.长期定位监测黑土土壤肥力的研究 I.黑土耕层有机质与氮素转化[J].*吉林农业科学*, 2004, **29**(5): 29-33.
- [15] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959, **37**(8): 911-917.
- [16] Zelles L, Bai Q Y, Beck T, *et al.* Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1992, **24**(4): 317-323.
- [17] Ringelberg D B, Sutton S, White D C. Biomass, bioactivity and biodiversity: microbial ecology of the deep subsurface: analysis of ester-linked phospholipid fatty acids [J]. *FEMS Microbiology Review*, 1997, **20**(3-4): 371-377.
- [18] Olsson P A, Thingstrup I, Jakobsen I, *et al.* Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1999, **31**(13): 1879-1887.
- [19] Bardgett R D, Walker L R. The measurement of soil fungal: bacterial biomass ratios as an indicator of ecosystem self-regulation in temperate meadow grasslands [J]. *Biology and Fertility of Soil*, 1999, **29**(3): 282-290.
- [20] Bailey V L, Smith J L, Bolton H Jr. Fungal-to-bacterial ratios in soils investigated for enhanced C sequestration [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2002, **34**(7): 997-1007.
- [21] Böhme L, Langer U, Böhme F. Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field

experiments [J]. Agriculture, Ecosystems and Environment, 2005, **109**: 141-152.

[22] Moscatelli M C, Lagomarsino A, Marinari S, *et al.* Soil microbial indices as bioindicators of environmental changes in a poplar plantation [J]. Ecological Indicators, 2005, **5**: 171-179.

[23] Widmer F, Rasche F, Hartmann M. Community structures and substrate utilization of bacteria in soils from organic and conventional farming systems of the DOK long-term field experiment [J]. Applied Soil Ecology, 2006, **33**(3): 294-307.

[24] Šimek M, Hopkins D W, Kalčík J, *et al.* Biological and chemical properties of arable soils affected by long-term organic and inorganic fertilizer applications [J]. Biology and Fertility of Soils, 1999, **29**: 300-308.

[25] Buyer J S, Kaufman D D. Microbial diversity in the rhizosphere of corn grown under conventional and low-input systems [J]. Applied Soil Ecology, 1996, **5**: 21-27.

[26] Kieft T L, Ringelberg D B, White D C. Changes in ester-linked PLFA profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, **60**(9): 3292-3299.

[27] Marschner P, Kandeler E, Marschner B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2003, **35**: 453-461.

[28] Hamel C, Hanson K, Selles F, *et al.* Seasonal and long-term resource-related variations in soil microbial communities in wheat-based rotations of the Canadian prairie [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2006, **38**(8): 2104-2116.

[29] Kennedy N M, Gleeson D E, Connolly J, *et al.* Seasonal and management influences on bacterial community structure in an upland grassland soil [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2005, **53**: 329-337.

《环境科学》编辑部关于启用编辑信息管理系统公告

《环境科学》编辑部已经开通本刊网站并启用编辑信息管理系统(网站地址: <http://www.hjkx.ac.cn>). 该系统能实现在线投稿、在线审稿、期刊浏览检索等功能, 欢迎广大作者、读者和审稿专家使用. 目前我刊所有来稿都通过网站编辑信息管理系统进行. 作者使用编辑信息管理系统投稿时请先进行注册, 注册完毕后以作者身份登录, 按照页面上给出的提示投稿即可. 如果您在使用过程中有问题, 请及时与我刊编辑部联系.

邮政地址: 北京市海淀区双清路 18 号《环境科学》编辑部
邮 编: 100085
电 话: 010-62941102, 010-62849343
传 真: 010-62849343
E-mail: hjkx@rcees.ac.cn
网 址: www.hjkx.ac.cn